

PENGARUH APLIKASI GEL EKSTRAK MEMBRAN KULIT TELUR BEBEK 10% TERHADAP KEPADATAN SERABUT KOLAGEN PADA PROSES PENYEMBUHAN LUKA GINGIVA

Agung Ikaputri Mulatpeni Novitasari*, Recita Indraswary**, Rosa Pratiwi***

Keywords:

Gingiva, collagen, wound healing, duck egg shell membrane

ABSTRACT

Background: Several processes in a teeth treatment often inflict wound in gingiva. Collagen is the key component of the wound healing. The collagen roles in advancing wound healing particularly, triggering the synthesis to induces collagen and cellular migration, and also inducing clotting cascades. Wound treatment using natural product is potential in accelerating wound healing, in particular duck egg membrane which contains collagen, glucosamine, and hyaluronic acid. This study aims to find out the influence of gel extract application of duck egg shell membrane 10 % towards collagen solidity on gingiva wound recovery process (study of *Rattus norvegicus*).

Method: The subjects of the study consist of 20 male *Rattus norvegicus* aged 2-3 months which were given wound on labial gingiva of the maxillary central incisors with punch biopsy. The samples were divided into 2 groups, they were positive control group (Alocclair Gel®) and experimental group (gel extract of duck egg shell membrane 10%), each of them was treated topically twice a day for one minute. The assessment of collagen fiber was done by giving score over the collagen fiber solidity of the histological tissue through 6 points of view. The observer done by two person (blind interpretation) score of collagen fiber solidity.

Result: The analysis result showed that there was a significant difference on collagen fiber solidity ($p > 0,05$) between positive control groups and experimental group on the 3rd, 7th, and 14th day.

Conclusion: This study concludes that the application of topical gel extract of duck egg shell membrane 10% affects the improvement of collagen fiber solidity on the process of healing gingiva wound on *Rattus norvegicus*

PENDAHULUAN

Beberapa tindakan dalam perawatan gigi sering menimbulkan perlukaan gingiva.¹ Gingiva sering mengalami luka dikarenakan trauma, penyakit periodontal, ekstraksi gigi, maupun tindakan bedah mulut.^{2,3} Penyembuhan luka gingiva adalah prosedur penting dalam mempertahankan homeostatis dan pengembalian integritas jaringan yang terluka.⁴ Proses ini melibatkan serangkaian interaksi antara berbagai jenis sel, mediator sitokin, maupun matriks ekstraseluler.⁵ Secara

umum, tahapan utama penyembuhan luka meliputi: hemostatis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling.⁶

Tingkat keparahan luka ditentukan oleh reorganisasi serat kolagen yang sekaligus menandai terjadinya fase proliferasi.⁷ Penundaan penyembuhan luka mengakibatkan tidak sempurnanya penutupan luka yang disebabkan gagalnya tahapan-tahapan normal penyembuhan luka.⁸ Oleh karena itu diperlukan suatu bahan untuk mempercepat penyembuhan luka.

Bahan alami sebagai sumber zat aktif

*Program Pendidikan Profesi Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung, **Departemen Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung, ***Departemen Periodonti Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung
Korespondensi: ikaputrimn28@gmail.com

yang dapat dimanfaatkan untuk mempercepat penyembuhan luka salah satunya adalah membran kulit telur bebek.⁹ Sumber bahan baku cangkang telur bebek tersedia cukup banyak dan saat ini belum dimanfaatkan. Oleh sebab itu, pemanfaatan cangkang telur bebek merupakan salah satu bentuk usaha yang cukup relevan untuk meningkatkan nilai ekonomi dan mengurangi limbah yang ada di lingkungan. Pada tahun 2009, produksi telur bebek sebesar 1.071.398 ton. Diperoleh data rata-rata berat telur bebek adalah 60 gram, sehingga kulit telur bebek yang dihasilkan dalam setahun adalah 107.139 ton.¹⁰

Membran kulit telur bebek diketahui mengandung glikosaminoglikan, seperti dermatan sulfat, kondroitin sulfat, asam hyaluronic, dan glikoprotein sulfat, termasuk hexosamines seperti glukosamin.¹¹ Selain dari kulit telur bebek, glukosamin diketahui juga terdapat pada cangkang seperti udang, lobster, dan kepiting.¹²

Membran kulit telur bebek telah lama digunakan di negara-negara Asia sebagai obat tradisional Cina untuk pemulihan luka bakar. Membran kulit telur bebek merupakan material yang berlimpah dan memiliki berbagai kegunaan di bidang nutrisi, kesehatan, perbaikan jaringan. Telah dilaporkan, konsumsi membran kulit telur bebek 500 mg/hari selama delapan minggu menunjukkan penurunan rasa nyeri. Natural Eggshell Membran (NEM®), merupakan olahan membran kulit telur bebek berupa suplemen diet, digunakan untuk mengurangi rasa nyeri dan kekakuan sendi seperti pada osteoarthritis dengan adanya kandungan glukosamin dan kondroitin.¹³ Selain itu, menurut penelitian yang telah diuji oleh Jun Jia membran kulit telur bebek dapat digunakan sebagai komponen pengisi Guide Tissue Regeneration (GTR) pada penyembuhan

luka kasus-kasus penyakit periodontal dalam sediaan larutan dengan konsentrasi 10%.¹⁴

Penanganan luka dan pengobatan yang tepat mampu mempercepat proses penyembuhan luka.¹⁵ Pemberian obat secara topikal absorpsinya lebih baik. Selain itu, dapat memberikan efek lokal yang optimal. Salah satu bentuk sediaan obat yang diberikan secara topikal adalah sediaan gel. Struktur sediaan gel dapat berpenetrasi dengan baik¹⁶ karena tidak mengalami first-pass metabolisme di hati.¹⁷

Berdasarkan penelitian yang ada, membran kulit telur bebek dapat menurunkan rasa nyeri dan penyembuhan luka sedangkan pemberian obat secara topikal dalam sediaan gel lebih optimal karena tidak mengalami first-pass metabolisme di hati. Oleh karena itu, penelitian kali ini akan menguji pengaruh aplikasi gel ekstrak membran kulit telur bebek terhadap peningkatan kepadatan serabut kolagen pada proses penyembuhan luka gingiva pada *Rattus norvegicus* yang belum pernah dilakukan sebelumnya.

METODE PENELITIAN

Desain penelitian. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Sampel berjumlah 20 ekor tikus *Rattus norvegicus* jantan dengan berat badan 200-250 gram kemudian dibagi 2 kelompok, yaitu kelompok perlakuan (10 ekor) dan kelompok kontrol positif (10 ekor).

Pembuatan perlakuan. Seluruh tikus sebelumnya diberi perlakuan, dilakukan anestesi ketamin 10mg/kgBB dan xyaline 1 mg/kgBB secara intramuskuler untuk memberikan efek sedasi. Tikus diberi perlakuan pada gingiva labial insisivus sentralis rahang atas menggunakan punch biopsy diameter 2,5 mm. Pada kelompok kontrol positif diinjeksikan

Alocclair Gel® dan kelompok perlakuan diinjeksikan gel ekstrak membran kulit telur bebek 10% secara topikal. Aplikasi dilakukan secara topikal dengan mengoleskan gel pada area perlakuan, kemudian dibiarkan selama 1 menit agar dapat berpenetrasi ke dalam mukosa, sebanyak 2 kali sehari yaitu pagi dan sore. Setiap kelompok diamati pada hari ke 3, 7, dan 14. Sebelum dilakukan pembuatan sediaan histopatologis, dilakukan euthanasia pada tikus kelompok perlakuan dan kelompok kontrol positif, masing-masing dilakukan pada 3 ekor tikus setiap waktu pengamatan berbeda dari keseluruhan tikus untuk melihat perbedaan pada hari ke-3, 7 dan 14 dengan menggunakan cara dislokasi.¹⁸

Pembuatan gel ekstrak membran kulit telur bebek 10%. Membran kulit telur bebek diambil 300 butir cangkang telur bebek, dipisahkan dari kulit telurnya, dicuci bersih dan ditimbang terlebih dahulu sebelum diproses. Sampel dimasukkan kedalam tabung homogenizer hingga homogen, kemudian ditambahkan larutan pelarut etanol 50%. Pembuatan ekstrak menggunakan teknik maserasi selama 24 jam, dilanjutkan dengan filtrasi menggunakan corong buhner dan filtrat dievaporasikan hingga kental untuk mendapatkan hasil ekstraksi. Setelah ekstrak membran kulit telur bebek telah selesai, dilanjutkan dengan memasukkan ekstrak ke dalam arutan CMC-Na 2% yang telah dipanaskan dan diaduk selama 10 menit sampai merata kemudian dipindahkan ke dalam wadah kemasan dan didinginkan hingga menjadi gel.

Identifikasi Kolagen. Pemeriksaan histopatologis menggunakan mikroskop elektrik perbesaran 13x40 dan masing-masing preparat dengan pewarnaan Trichrom Mallory dinilai dengan menggunakan penilaian kepadatan serabut kolagen dilakukan dengan

memberi skor atas kepadatan serabut kolagen pada preparat histologis jaringan yang mengalami perlakuan dari masing-masing preparat melalui 6 lapang pandang oleh dua orang pengamat dengan menyamakan interpretasi skor kepadatan serabut kolagen antar pengamat. Kriteria penilaian serabut kolagen menurut Tandililin dkk (2006) ialah sebagai berikut¹⁹;

- Skor 1 : kepadatan serabut kolagen kurang dari 50% dengan struktur jaringan kurang padat, terdapat banyak sel-sel, vaskularisasi dan sel-sel mononuklear.
- Skor 2 : kepadatan serabut kolagen lebih dari 50% dengan struktur jaringan lebih padat, sedikit reaksi inflamasi.
- Skor 3 : kepadatan serabut kolagen normal yang avaskuler dan aseluler.

Pembacaan hasil preparat histopatologi diamati dengan cara blind interpretation yaitu keseluruhan preparat yang sebelumnya sesuai dengan nama tiap kelompok, diubah dengan diberi kode yang berbeda oleh oranglain yang tidak melakukan penelitian ini. Kemudian preparat yang telah diberi kode tertentu tadi selanjutnya dilakukan pembacaan skoring kepadatan serabut kolagen. Metode ini dilakukan supaya hasil yang diperoleh tidak bias, sehingga kita tidak dapat menentukan waktu pengamatan hanya dengan gambaran kepadatan serabut kolagennya saja.

Analisis data. Hasil SPSS dari perhitungan kepadatan serabut kolagen masing-masing dilakukan uji normalitas menggunakan Kolmogorov smirnov dan Shapiro wilk ternyata data tidak terdistribusi normal. Setelah itu dilanjutkan analisa uji statistik nonparametrik uji U Mann whitney untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak membran kulit telur bebek

10%. Dengan persamaan persepsi kedua pengamat dilakukan uji korelasi Spearman.

HASIL PENELITIAN

Setelah dilakukan serangkaian perlakuan percobaan didapatkan hasil rerata kepadatan serabut kolagen pada Tabel 1. Dari hasil perhitungan kepadatan serabut kolagen diketahui bahwa pada kelompok perlakuan (ekstrak gel membran kulit telur bebek 10%) memiliki kepadatan serabut kolagen lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol positif (Alocclair Gel®).

Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa sebaran data pada setiap kelompok tidak normal, ditunjukkan oleh nilai signifikansi pada uji Kolmogorov smirnov dan Shapiro wilk setiap kelompok $p < 0,05$. Maka, uji analisis statistik menggunakan uji nonparametrik dengan data berskala ordinal dengan uji U Mann whitney

Data yang disajikan pada Tabel 2 sebagian besar menunjukkan nilai $p < 0,05$, yang memiliki arti bahwa sebagian besar kelompok memiliki perbedaan yang bermakna antar kedua

kelompok tersebut pada waktu pengamatan. Berdasarkan uji U Mann whitney, dapat diinterpretasikan pada hari ke-3, 7, dan 14 terdapat perbedaan kepadatan serabut kolagen yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan.

Persamaan persepsi antar pengamat dilakukan sebelum pengamatan dilangsungkan dan selanjutnya data yang diperoleh, dianalisis statistik untuk mengetahui kesepakatan antar pengamat. Analisis statistik yang digunakan adalah uji korelasi Spearman. Hasil dari uji korelasi Spearman menunjukkan $p < 0,05$ yang menjadi syarat adanya suatu korelasi antar pengamat. Nilai korelasi Spearman sebesar 0,700 dengan Sig. 0,001 sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat kekuatan korelasi yang kuat. Hal ini menandakan bahwa pengamat 1 dan pengamat 2 memiliki persepsi yang sama dalam melakukan penilaian kepadatan serabut kolagen.

Diperoleh nilai keefektifan perbedaan kedua kelompok antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol positif, dengan perhitungan kedua rerata bahwa data kelompok perlakuan



Gambar 1. Gambaran kolagen pada kelompok perlakuan yang baru terbentuk secara mikroskopis perbesaran 13 x 40 pada area luka dengan pengecatan Trichrom Mallory.

Tabel 1. Rerata dan simpangan baku kepadatan serabut kolagen kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan pada hari ke-3, 7 dan 14.

| Hari ke- | n | Rerata \pm SB | |
|----------|---|------------------|--------------------|
| | | Kelompok kontrol | Kelompok perlakuan |
| 3 | 3 | 1,50 \pm 0,618 | 2,06 \pm 0,416 |
| 7 | 3 | 1,94 \pm 0,236 | 2,50 \pm 0,514 |
| 14 | 3 | 1,98 \pm 0,383 | 2,61 \pm 0,502 |

Tabel 2. Hasil uji U Mann-Whitney Kepadatan Serabut Kolagen Kelompok Kontrol Positif dan Kelompok Perlakuan pada Hari Ke-3, 7 dan 14.

| | KKK1H3 | KKK2H3 | KKK1H7 | KKK2H7 | KKK1H14 | KKK2H14 |
|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| KKK1H3 | | 0.003* | 0.005* | 0.000* | 0.001* | 0.000* |
| KKK2H3 | | | 0.324 | 0.009* | 0.420 | 0.002* |
| KKK1H7 | | | | 0.006* | 0.045* | 0.000* |
| KKK2H7 | | | | | 0.007* | 0.508 |
| KKK1H14 | | | | | | 0.007* |
| KKK2H14 | | | | | | |

lebih tinggi 32,3% dibandingkan kelompok kontrol positif. Hal ini menandakan dengan bahan alami membran kulit telur bebek 10% lebih baik 32,3% dibandingkan dengan Alocclair Gel®

DISKUSI

Pada hari ke-1 setelah perlukaan tidak dilakukan penilaian kepadatan serabut kolagen karena pada area perlukaan belum terbentuk kolagen baru, hanya terdapat kolagen lama yang mampu mengaktivasi platelet untuk menginisiasi penyembuhan luka.²⁰ Sel-sel darah dilepaskan pada awal fase inflamasi yang berlangsung pada hari ke-1 hingga ke-5 setelah perlukaan untuk membantu pembentukan jendalan darah sehingga pada gambar tampak sel-sel darah (warna merah) yang masih tersebar di area perlukaan.

Tiga hari kemudian setelah perlukaan, dilakukan pengamatan mikroskopis pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan. Sesuai dengan pernyataan bahwa serabut kolagen yang baru terbentuk akan terlihat berwarna lebih muda (Gambar 1) dengan pengecatan Trichrom Mallory dan pada hari ke-3 terjadi proliferasi fibroblas yang mampu mensintesis kolagen sebagai komponen matriks ekstraseluler.^{21,22}

Kepadatan serabut kolagen pada hari ke-3 terlihat sel-sel inflamasi dan eritrosit yang masih tersebar di sekitar area perlukaan. Hal ini dikarenakan pada hari ke-3 terjadi overlapping antara fase inflamasi dan fase proliferasi penyembuhan luka.²³ Pada hari ke-3 setelah perlukaan mulai terjadi migrasi dan proliferasi fibroblas yang berperan dalam sintesis kolagen ke area luka sehingga serabut kolagen mulai tampak pada area luka.^{24,25}

Tujuh hari kemudian, berjalan normal dan sesuai dengan pernyataan Nanci (2003) bahwa pada hari ke-3 setelah perlukaan sudah terbentuk serabut kolagen baru di area luka dan diantara hari ke-5 hingga hari ke-20 setelah perlakuan kolagen akan terdeposisi secara berlanjut, cepat, dan diikuti dengan peningkatan tensile strength jaringan.²⁶ Hal ini sesuai dengan teori Kiani dkk. (2014) bahwa peningkatan sintesis kolagen terus berlanjut hingga minggu ke-2 setelah perlukaan.²⁷

Pada hari ke 14 dilakukan pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa serabut kolagen terbentuk setelah perlukaan memiliki warna yang semakin pekat dan padat (Gambar 1)

dengan pengecatan Trichrom Mallory. Hal ini dapat disebabkan karena fibril-fibril kolagen yang terbentuk sebelumnya telah mengalami cross-linking ke bentuk yang lebih tebal

sehingga terjadi peningkatan serabut kolagen dan sintesis kolagen mencapai puncak sekitar hari ke-14.

Setelah dilakukan analisis dengan uji U Mann whitney, menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna ($p>0,05$) pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan pada hari ke-3, 7 dan 14. Hal ini berarti bahwa pengaruh pemberian gel ekstrak membran kulit telur bebek 10% memiliki pengaruh yang lebih baik dari pada Aloclair Gel®. Aloclair Gel® telah digunakan sebagai obat ulkus yang memiliki kandungan

Polyvinylpyrrolidon (PVP) yang memiliki aktivitas mukoprotektif.²⁸ PVP ini bekerja dengan membentuk lapisan diatas ulkus yang akan melindungi ujung saraf yang terkena sehingga dapat mencegah iritasi dan mengurangi rasa nyeri pada ulkus. Kandungan asam hialuronat dan aloe vera pada Aloclair Gel® mendukung terjadinya proses penyembuhan yang alami dari jaringan yang mengalami kerusakan.²⁹

Di dalam komposisi Aloclair Gel® tidak terdapat kolagen. Padahal kolagen adalah komponen kunci pada proses penyembuhan luka. Peran kolagen dalam mempercepat penyembuhan luka antara lain memicu sintesis protein, deposisi matriks, diferensiasi sel, angiogenesis, mitogenesis, menginduksi kolagen, dan migrasi seluler seperti keratinosit, epitelisasi, fibroblas, monosit, makrofag, neutrofil, induksi kolagenase, kontraksi luka, agregasi platelet, serta menginduksi clotting cascades.^{30,31} Meningkatnya serabut kolagen menandakan adanya penyembuhan luka.³²

Membran kulit telur bebek juga terbukti mengandung glikosaminoglikan seperti dermatan sulfat, kondroitin sulfat, glikoprotein sulfat termasuk heksosamin yang terdiri dari glukosamin, asam hialuronat, asam sialik, demosin, isodesmosin, ovotransferin,

lysyl oxidase, dan lisozim. Hal ini berperan penting dalam proses penyembuhan luka dengan menunjukkan efek stimulasi pada pembentukan matriks, meningkatkan respon inflamasi, dan memodulasi sintesis asam hialuronat dengan merangsang sintesis matriks ekstraseluler termasuk kolagen pada jaringan dalam proses penyembuhan luka dan anti-inflamasi dengan menekan fungsi neutrofil dan produksi kemokin.³³

Menurut Kaweewong dkk (2013), membran kulit telur bebek merupakan membran double-layer berwarna merah muda terang sampai putih yang terdiri dari ikatan protein keratin, kolagen tipe I dan elastin, dan asam uronik. Kolagen sendiri berdasarkan molekulnya, kolagen diklasifikasikan menjadi 3 tipe, Tipe I, II, III yang merupakan kolagen fibrous (Whiting dan Zernicke, 2008).³⁴ Kolagen Tipe I ditemukan di semua jaringan ikat, termasuk kulit, tendon, ligamen dan tulang. Strukturnya terdiri atas heteropolimer (rantai alfa-1 dan alfa-2) dan glycine (tanpa tryptophan dan cysteine).³⁵ Peran kolagen Tipe I yakni sebagai matriks protein ekstraseluler dengan karakteristik peningkatan proliferasi sel sehingga secara langsung mempengaruhi fisiologis dan morfologi sel.³⁶

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh kesimpulan yaitu aplikasi gel ekstrak membran kulit telur bebek 10% dapat berpengaruh meningkatkan kepadatan serabut kolagen pada proses penyembuhan luka gingiva (kajian pada *Rattus norvegicus*).

DAFTAR PUSTAKA

1. Ismardianita, E., Soebijanto, Sutrisno. 2012. Pengaruh Kuretase Terhadap Penyembuhan Luka Pasca Pencabutan Gigi dan Kajian Histologis Pada Tikus Galur Wistar. *Dentika Dental Jurnal*. (125):255
2. Shim, K.M., Choi, S.H., Jeong, M., Kang, S.S. 2007. Effects of Aucubin on The Healing of Oral Wounds, *In Vivo*, 21:1037-1042
3. David, K., Heather, O. 2013. *Wound Care Canada: The Basic Principles of Wound Healing*, 9(2)
4. Park, N., Valacchi G., Lim, Y. 2010. Effect of Dietary Conjugated Linoleic Acid Supplementation on Early Inflammatory Responses during Cutaneous Wound Healing. *Mediators of Inflammation*, 8
5. Mackay, D., Miller, A.L. 2003. Nutritional Support for Wound Healing, *Alternative Medicine Review*, 8(4): 359-377
6. Baranoski A, Ayello EA. 2008. Skin : An essential organ. In (Baranoski S, Ayello EA, eds). *Wound Care Essentials Practise Principles*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, pp.47-60
7. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. 2007. *Robbins and Contran Pathologic Basic of Disease*, 7 th. Elsevier Inc: Philadelphia
8. Mathieu, D., Linke, J.C., Wattel, F. 2006. Non-Healing Wounds, in Mathieu D., *Hanbook on Hyperbaric Medicine*, Springer, Dordrecht, 401–402
9. Ohto-Fujita, E., Konno, T., Shimizu, M., Ishihara, K., Sugitate, T., Miyake, J., Yoshimura, K., Taniwaki, K., Sakurai, T., Hasebe, Y., Atomi, Y. 2011. Hydrolyzed Eggshell Membrane Immobilized on Phosphorylcholine Polimer Supplies Extracellular Matrix Environment for Human Dermal Fibroblast, *Cell and Tissue Research*, 345(1):177-190
10. Mahreni, Endang Sulistyawati. 2011. Pemanfaatan Kulit Telur Sebagai Katalis Biodiesel dari Minyak Sawit dan Metanol. ISSN: 1411 – 4216 2011: hal C-09-1 s/d C-09-6
11. Cordeiro, C.M., Hincke, M.T. 2011. Recent Patents on Eggshell: Shell and Membrane Applications. *Recent Pat Food NutrAgric*, 3: 1–8
12. Shantosh, S., Mathew, P.T. 2007. Preparation of Glucosamine and Carboxymethylchitin From Shrimp Shell. *Journal of Applied Polymer Science*, 107: 280-285
13. Ruff, K.J., Endres, J.R., Clewell, A.E., Szabo, J.R., Schauss, A.G. 2012. Safety Evaluation of A Natural Eggshell Membrane-derived Product, *Food and Chemical Toxicology*, 50(3):604-611
14. Jun Jia, Chao Xian Guo, Jian Yu, Yuanyuan Duan. 2011. A New Candidate for Guide Tissue Regeneration: Biomimetic eggshell Membrane. *Irnj Med Hypotheses Ideas*, 5(20)
15. Hasamnis, A.A., Mohanty, B.K., Muralikrishna, P.S. 2010. Evaluation of Wound Healing Effect of Topical Phenytoin on Excisional Wound in Albino Rats, *J Young Pharm*, 2(1) : 59-62
16. Coaccioli, S. 2011. Ketoprofen 2.5% Gel: a Clinical Overview, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15: 943-949
17. Rosdhal, C.B., Kowalski, T. 2008. *Textbook of Basic Nursing*, LippincottWilliams and Wilkins, Philadelphia, h. 795
18. American Veterinary Medical Association. 2007. *AVMA Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia)*, AVMA, America, h.14
19. Tandelilin, R.T.C., Sofro, A.S.M., Santoso, A.S., Soesatyo, M.H.N.E., Asmara, W. 2006. The Density of Collagen Fiber in Alveolus Mandibular Bone of Rabbit after Augmentation with Powder Demineralized Bone Matrix Post Incisivus Extraction, *Majalah Kedokteran Gigi*, 39(2):43-47
20. Steed, D.L. 1997. The Role of Growth Factor In Wound Healing, *Surgical Clinics of North America*, 77(3):575-586
21. Jones, M.L. 2010. Mastering the Trichrome Stain, *Connection*, h-79-84
22. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. 2007. *Robbins and Contran Pathologic Basic of Disease*, 7 th. Elsevier Inc: Philadelphia
23. Sussman, C., Bates-Jensen, B. 2007. *Wound Care A Collaborative Practice Manual for Health Professionals*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, hal. 37-39
24. Regan, M. C. dan Barbul, A. 1994. *The Cellular Biology of Wound Healing*, Springer-Verlag, Berlin, h. 1-4
25. Andreasen, J.O., Andreasen, f.M., dan Andersson, L. 2007. *Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth*, Blackwell Munksgaard, Denmark. H. 6-43
26. Nanci, A. 2005. *Ten Cate's Oral Histology Development, Structure, and Function*, 6th ed., St.Louis, Mosby, h-65-8, 397-403
27. Kiani, F. A., Kachiwal, A. B., Shah, M. G., Khan, M. S., Lochi, G. M., Manan, A., HaQ, I., dan Khan, F.M. 2014. Histological Characterization of Wound Healing of Flank Verses Midline Ovariohysterectomy in Different Age Groups of Cats, *Journal of Clinical Pathology and Forensic Medicine*, 5 (2): 6-16
28. Cimaz, Rolando, M.D. 2002. Safety and Afficacy of Aloclair in Treatment of Oral Aphthous Lesion in Children, *Clinical valuation Report: Sinclair*, h. 1-6
29. Sinclair, Aloclair Plus Gel-Informationleaflet. <http://www.alocclairplus.co.uk/>. 2012. Diakses tanggal 10 November 2016
30. Brett, D. 2008. A Review of Collagen and Collagen-based Wound Dressings, *Wounds*, 20(12):1-5
31. Rangaraj, A., Harding, K., Leaper, D. 2011. Role of Collagen in Wound Management, *Wounds*, 7(2):54-63
32. Sandhu, S.V., Gupta, S., Bansal, H., Singla, K. 2012. Collagen in Health and Disease, *Journal of Orofacial Research*, 2(3):153-159
33. DeVore, D.P., Long, F.D. 2013. Anti-Inflammatory Activity of Eggshell Membrane and Processed Eggshell Membrane Preparations, *IP Research Communities*, 424(581):1-9

34. Jongjareonrak, A., Benjakula, S., Visessanguanb, W., Prodpranc, T., dan Tanakad, M. 2006. Characterization of Edible Films from Skin Gelatin of Brownstripe Red Snapper and Bigeye Snapper. *Food Hydrocolloids*, 20: 492-501
35. Kaweewong, K., Garnjanagoonchorn, W., Jirapakkul, W., dan Roytrakul, S., 2013. Solubilization and Identification of Hen Eggshell Membrane Proteins During Different Times of Chicken Embryo Development Using the Proteomic Approach. *Protein J*, 32:297–308
36. Cordoso, V.S., Quelemes, P. V., Amorin, A., Primo, F.L., Gobo, G.G., Tedesco, A.C., Mafud, A.C. 2014. Collagen Based Silver Nanoparticles for Biological Applications : Synthesis and Characteization, *Journal of Nanobiotechnology*, 12(36): 1-9